

# Etablissement d'une clé d'identification variétale chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par les marqueurs microsatellites

S. Zehdi<sup>1</sup>, J.C. Pintaud<sup>2</sup>, N. Billotte<sup>3</sup>, A. Ould Mohamed Salem<sup>4</sup>, H. Sakka<sup>1</sup>, A. Rhouma<sup>5</sup>, M. Marrakchi<sup>1</sup> et M. Trifi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de génétique moléculaire, immunologie et biotechnologie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 2092 El Manar Tunis, Tunisie. Tel.: +216-71872600 ; Fax: +216-71885408/ 71885480 ; Corresponding author's email: Mokhtar.t@fst.mu.tn

<sup>2</sup>IRD (Institut de Recherche pour le Développement), UMR DGPC/DYNADIV, 911 Avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

<sup>3</sup>CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), UMR 1096 Polymorphismes d'Intérêt Agronomique, TA 40/03 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

<sup>4</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nouakchott, B.P. 5026, Mauritanie

<sup>5</sup>IPGRI, INRAT, CRPh, 2260 Degache, Tunisie

## Résumé

Etablissement d'une clé d'identification variétale chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par les marqueurs microsatellites

Le typage moléculaire de 48 écotypes tunisiens de palmier dattier a été entrepris grâce à l'utilisation de la technique d'analyse des microsatellites ou SSR. Les résultats obtenus montrent qu'au total 100 allèles correspondant à 16 locus microsatellites ciblés ont été générés ce qui témoigne de l'hypothèse selon laquelle la palmeraie tunisienne est caractérisée par une importante diversité au niveau de l'ADN. L'exploitation de ces marqueurs microsatellites a permis non seulement de mettre en évidence une conformité intra-cultivar mais également d'établir les empreintes génétiques des écotypes analysés. Ce résultat suggère l'existence d'un profil SSR consensus et spécifique de tous les palmiers appartenant à une variété donnée. En outre, la mise à profit des génotypes multilocus en nous basant seulement sur 3 locus microsatellites a permis d'établir une clé d'identification variétale avec une efficacité absolue de discrimination. Notons que cette clé est beaucoup plus efficace que celles basées sur les marqueurs isoenzymatiques et CAPS et rapportées chez cette espèce. L'opportunité des résultats ainsi obtenus est discutée en rapport avec le contrôle de la conformité des rejets et/ou des vitroplants de palmier dattier.

## Summary

Use of SSR markers to provide an identification key for date-palm varieties (*Phoenix dactylifera* L.)

Molecular typing of 48 Tunisian date-palm ecotypes was performed using microsatellite or SSR analysis. A total of 100 alleles corresponding to 16 targeted microsatellite loci were generated, which provides evidence for a significant DNA diversity among Tunisian date-palms. Using those microsatellite markers not only highlighted the intra-cultivar homogeneity, but allowed for genetic fingerprinting of the ecotypes. The data suggests that there is a specific consensus SSR profile for all date-palms among a given variety. Moreover, by using multiloci genotyping with only 3 microsatellites, a varietal identification key was created allowing for perfect discrimination. This identification key is much more effective than existing keys based on isozyme and CAPS markers for this species. Suitability of the data to check conformity of date-palm suckers and/or vitroplants is being discussed.

**Key words:** *Phoenix dactylifera* L., date-palm, SSR markers, genetic fingerprinting, varietal identification

## Resumen

Establecimiento de una clave de identificación varietal de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) mediante marcadores microsatélites

Se emprendió la tipificación molecular de 48 ecotipos tunecinos de palma datilera mediante la técnica de análisis de microsatélites o SSR. Los resultados obtenidos muestran que se generaron en total 100 alelos correspondientes a 16 locus microsatélites a los que se apuntaba, lo que prueba la hipótesis con arreglo a la cual el palmar tunecino se caracteriza por una importante diversidad a nivel de ADN. La explotación de estos marcadores microsatélites permitió no solo evidenciar una conformidad intra-cultivar sino también establecer las improntas genéticas de los ecotipos analizados. Este resultado sugiere la existencia de un perfil SSR concordante y específico de todas las palmas pertenecientes a una variedad dada. Además el aprovechamiento de los genotipos multilocus basándonos tan solo en 3 locus microsatélites permitió establecer una clave de identificación varietal con una eficacia absoluta de discriminación. Notemos que esta clave es mucho más eficiente que las basadas en los marcadores isoenzimáticos y CAPS de los que se ha informado respecto de esta especie. Se debate la conveniencia de los resultados así obtenidos con relación al control de la conformidad de los retoños y/o de las vitroplantas de la palma datilera.

## Introduction

En Tunisie, le palmier dattier occupe une place stratégique dans la stabilité socioéconomique de l'agrosystème oasien. En effet, il constitue l'axe principal de l'agriculture dans les régions désertiques et assure la principale ressource financière des oasiens. La population tunisienne vivant aux dépens de la phoeniculture est estimée à environ 10% (EL Hadrami et al. 1998). En outre, les oasis tunisiennes sont caractérisées

par une richesse génétique considérable comme en témoigne la présence d'au moins 250 cultivars répertoriés (Rhouma 1994). Cependant, avec l'évolution économique et sociale du pays, les palmeraies de Jérid et de Nefzaoua sont réorganisées pour satisfaire une demande sans cesse croissante en dattes de qualité supérieure à l'instar du cultivar 'Deglet Nour'. Cette réorganisation a fait que la phoeniculture est passée

d'un système de culture traditionnelle riche et diversifiée à un système industriel axé sur une oligoculture voire monovariétale (Rhouma 1996). Ainsi, cette reconversion des palmeraies a entraîné une érosion génétique sévère de la diversité génétique du patrimoine phoenicicole. En outre, cette situation est fortement aggravée par divers stress biotiques et abiotiques. En effet, nos palmeraies sont constamment menacées par une fusariose appelée localement 'Bayoud' due au champignon tellurique *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis*. De même, elles constituent le foyer de la maladie des feuilles cassantes dont les causes sont actuellement non élucidées (Takrouni et al. 1988). L'ensemble de ces facteurs constitue une forte contrainte au développement de la phoeniciculture tunisienne en dépit des efforts consentis de rénovation et de reconstitution de nouvelles palmeraies (Rhouma 1996). Il est donc impératif d'élaborer diverses actions visant la sauvegarde de ces ressources phytogénétiques. Dans cette optique, l'évaluation et l'identification variétale de ces ressources constituent non seulement l'une des composantes essentielles pour une gestion rationnelle du patrimoine phoenicicole mais contribuent également à l'amélioration de ce secteur agricole. En effet, l'exploration des potentialités de chaque cultivar ainsi que l'établissement d'une clé d'identification constituent un outil précieux pour le contrôle des rejets et des vitroplants de palmier dattier. Notons que les paramètres morphologiques sont traditionnellement utilisés pour discriminer les cultivars. Toutefois, d'autres informations relatives au matériel végétal sont nécessaires afin de répondre aux exigences des agriculteurs en matière de certification des plantes issues de rejets ou produites par micropropagation, notamment à un stade précoce pour les cultivars élités. Il est donc impératif d'élaborer une méthode rapide permettant de discriminer d'une façon fiable les variants génotypiques chez cette espèce. A ce sujet, plusieurs travaux décrivant l'apport de divers marqueurs afin de parvenir à une identification variétale efficace ont été déjà rapportés. Ainsi, l'utilisation des marqueurs morphologiques et analytiques a été rapportée pour identifier les variétés tunisiennes de palmier dattier (Reynes et al. 1994; Rhouma 1994). De même, les protéines iso-enzymatiques ont été d'un grand apport dans la discrimination des cultivars de palmier dattier. En effet, en se basant sur les génotypes multilocus de quatre systèmes enzymatiques, Ould Mohamed Salem et al. (2001) ont pu caractériser 27 cultivars parmi 29 étudiés. Cependant, bien qu'ils soient relativement efficaces pour différencier les génotypes de palmier, ces marqueurs présentent quelques inconvénients. En effet, ils sont en nombre qui reste encore limité et sont souvent sujets à des variations dues au stade de développement. De même, leur expression est souvent restreinte au stade de développement des organes et/ou des tissus. Afin de contourner ces difficultés, Sakka et al. (2003) ont exploité l'analyse de la diversité moléculaire du génome chloroplastique pour générer des marqueurs moléculaires susceptibles de différencier les cultivars tunisiens de palmier dattier. Ces auteurs ont d'ailleurs démontré que 38 écotypes de palmier dattier se répartissent sur 29 haplotypes mis en évidence. Ces derniers ont permis d'identifier seulement

28 génotypes soit un pourcentage d'efficacité de 71%. Toutefois, tenant compte du faible nombre de marqueurs polymorphes identifiés ainsi que de la durée, relativement longue, de l'expérimentation nécessaire pour la mise en évidence de ces marqueurs, l'établissement des empreintes génétiques permettrait de résorber les difficultés décrites précédemment. Pour ce faire, nous avons tenté de mettre à profit les possibilités offertes par l'analyse des marqueurs microsatellites chez le palmier dattier. En effet, et contrairement aux autres marqueurs, les microsatellites présentent toutes les caractéristiques d'un bon marqueur moléculaire. De même, cette stratégie présente plusieurs avantages notamment: (i) leur nombre est illimité ou presque; (ii) leur expression n'est pas nécessaire pour leur détection; et (iii) de faibles quantités de matériel végétal et/ou d'ADN sont requises pour leur mise en évidence étant donné la grande sensibilité de la technique. Tenant compte de toutes ces considérations, nous avons développé la technique d'analyse des séquences microsatellites ou Simple Sequence Repeats (SSR) afin de caractériser moléculairement les génotypes tunisiens de palmier dattier. Notons que plusieurs études ont rapporté l'efficacité de la SSR non seulement pour explorer la diversité génétique mais également pour discriminer les variants génotypiques aux niveaux inter et intra-spécifiques grâce à l'établissement des empreintes génétiques de chaque individu (Testolin et al. 2000; Alvarez et al. 2001).

Dans le présent article nous relaterons la mise à profit de la technique SSR afin de générer des marqueurs moléculaires utilisables pour une identification fiable de quelques écotypes tunisiens de palmier dattier.

## Matériel et méthodes

### Matériel biologique

Au cours de ce travail, nous avons utilisé 48 écotypes tunisiens de palmier dattier (Tableau 1). Il s'agit de 7 pollinisateurs et de 40 variétés qui ont été choisies pour leur bonne qualité dattière et/ou pour leur abondance dans les palmeraies tunisiennes. Nous avons par ailleurs inclus un écotpe de l'île de Kerkennah (i.e. 'Tamri') où le dattier n'a subi aucune action sélective de la part des agriculteurs. Notons que deux variétés étrangères récemment introduites dans les palmeraies tunisiennes ont été également analysées au cours de cette étude. Il s'agit de 'Ghars Mettig' et de 'Zehdi' provenant de l'Algérie et de l'Iraq, respectivement.

Le matériel végétal, constitué de jeunes palmes prélevées sur des palmiers adultes, nous a été aimablement fourni par le Centre de Recherches Phoenicoles, INRAT, Degache, situé au sud du pays.

### Extraction de l'ADN cellulaire total

Afin d'extraire de l'ADN de bonne qualité, nous avons utilisé le kit DNeasy™ Plant Mini Kit et adopté le protocole préconisé par le fournisseur (Qiagen, France). Toutes les préparations d'acides nucléiques ont été soumises à une électrophorèse

**Tableau 1. Liste des accessions utilisées au cours de cette étude**

Numéro	Ecotype
01	Deglet Nour <sup>T</sup>
02	Boufagous
03 <sup>†</sup>	Ftimi1
04	Kenta
05	Kintichi
06 <sup>†</sup>	Deglet Bey 2
07	Ghars Mttig
08	Zehdi
09	Arichti
10	Khou Ftimi
11	Horra
12	Okhet Degla
13	T124 m
14	T138 m
15	T158 m
16	T169 m
17	DF1
18	DG9 m
19	Rochdi
20	Lemsi
21	Bouhattam
22	Smiti
23	Denga
24	Hamra
25	Aguiwa
26	Kharroubi
27	Angou
28	Bejjou
29	Goundi
30	Halwaya
31	Tazerzit Safra
32	Tazerzit Soda
33	Ammari
34	Besser Hlou
35	Mahmoudia
36	Chodak
37	Rhaimya
38	Om Lal
39	Om Essayed
40	Bidh Hmam
41	Gasbi
42	Deglet Nour <sup>K</sup>
43	Kchdou Ahmar
44	Fhal Ksebba
45	Rakli
46	Fermla
47	T159m
48	Tamri

<sup>†</sup>03 et 06 : Cultivars appelés 'Alligue' et 'Menakher' respectivement.  
T (Tozeur) ; K (Kébili).

analytique sur gel d'agarose 0,8% en présence de bromure d'éthidium (1 µg.ml<sup>-1</sup>) afin de tester leur aspect qualitatif (Sambrook et al. 1989). L'estimation de la concentration en acides nucléiques a été faite selon la méthode spectrométrique en utilisant un GeneQuant (Pharmacia, France).

### **Amorces et réaction de polymérisation enzymatique en chaîne**

Nous avons utilisé les oligonucléotides identifiés au CIRAD de Montpellier (Billotte et al., 2004). Il s'agit d'amorces spécifiques de locus, isolées par criblage avec des sondes (GA)<sub>n</sub> à partir d'une banque génomique de palmier dattier enrichie en (GA)<sub>n</sub>. Le tableau 2 présente les séquences ainsi que les caractéristiques de ces amorces.

La réaction de polymérisation enzymatique en chaîne ou PCR est réalisée dans une microplaque de 96 puits contenant chacun le mélange réactionnel suivant : 1 µl d'ADN matrice (20 à 30 ng), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM d'amorces sens comportant une queue M13 du côté 5'; 0,2 µM d'amorces sens et anti-sens; 0,6 µM de l'oligonucléotide M13 marqué à la fluorescence visible à 700 nm; 200 µM d'un mélange de dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Promega Corp. Madison, USA); 1 µl de tampon de la Taq DNA polymérase (10 ×) (Promega); 0,625 U de Taq DNA polymérase (Promega) et qsp 10 µl H<sub>2</sub>O.

La plaque PCR est ensuite placée dans un thermocycleur (Biometra GmbH, Goettingen, Allemagne) programmé pour effectuer les cycles suivants: une incubation préalable à 95°C pendant 5 min suivie de 40 cycles comportant chacun les trois étapes suivantes : une dénaturation pendant 30 secondes à 95°C, une hybridation pendant 1 min à 52°C et une synthèse pendant 1 min à 72°C. Une extension finale à 72°C pendant 7 min a été toujours programmée à la fin du dernier cycle d'amplification.

La migration ainsi que l'acquisition de l'image du gel sont faites grâce au Li-Cor IR2 automated DNA sequencer (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) en utilisant un gel de polyacrylamide à 6,5% préparé en utilisant 25 ml d'une solution de polyacrylamide Kbplus 6,5% Gel matrix (Li-Cor, USA), 18,75 µl de TEMED et 187,5 µl de persulfate d'ammonium à 10%.

Le logiciel SAGA<sup>TM</sup> a été utilisé afin de traiter l'image brute et de définir avec précision les allèles correspondant à chaque locus.

### **Etablissement de la clé d'identification**

Dans le but d'établir la clé d'identification variétale nous nous sommes basés sur le principe de la classification hiérarchisée des locus selon leur nombre d'allèles. Les accessions sont par la suite ordonnées en regroupant celles qui possèdent le même génotype jusqu'à obtention de la combinaison allélique propre à chaque accession.

## **Résultats et discussion**

### **Mise en évidence d'une conformité intra-cultivar**

L'analyse de la diversité génétique chez une espèce donnée nécessite obligatoirement l'estimation du polymorphisme

**Tableau 2. Locus SSR étudiés et leurs amorces respectives**

Locus	Motif répété	Séquence des amorces (5'-3')	
		F: Forward	R: Reverse
mPdCIR010	(GA) <sup>22</sup>	F: ACCCCGGACGTGAGGTG	R: CGTCGATCTCCTCCTTTGTCTC
mPdCIR015	(GA) <sup>15</sup>	F: AGCTGGCTCCTCCCTTCTTA	R: GCTCGGTTGGACTTGTTCT
mPdCIR016	(GA) <sup>14</sup>	F: AGCGGGAAATGAAAAGGTAT	R: ATGAAAACGTGCCAAATGTC
mPdCIR025	(GA) <sup>22</sup>	F: GCACGAGAAGGCTTATAGT	R: CCCCTCATTAGGATTCTAC
mPdCIR032	(GA) <sup>19</sup>	F: CAAATCTTTGCCGTGAG	R: GGTGTGGAGTAATCATGTAGTAG
mPdCIR035	(GA) <sup>15</sup>	F: ACAAACGGCGATGGGATTAC	R: CCGCAGCTCACCTCTTCTAT
mPdCIR044	(GA) <sup>19</sup>	F: ATGCGGACTACACTATTCTAC	R: GGTGATTGACTTTCTTTGAG
mPdCIR048	(GA) <sup>32</sup>	F: CGAGACCTACCTTCAACAAA	R: CCACCAACCAAATCAAACAC
mPdCIR050	(GA) <sup>21</sup>	F: CTGCCATTTCTTCTGAC	R: CACCATGCACAAAAATG
mPdCIR057	(GA) <sup>20</sup>	F: AAGCAGCAGCCCTTCCGTAG	R: GTTCTCACTCGCCCAAAAATAC
mPdCIR063	(GA) <sup>17</sup>	F: CTTTTATGTGGTCTGAGAGA	R: TCTCTGATCTTGGGTTCTGT
mPdCIR070	(GA) <sup>17</sup>	F: CAAGACCCAAGGCTAAC	R: GGAGGTGGCTTTGTAGTAT
mPdCIR078	(GA) <sup>13</sup>	F: TGGATTTCCATTGTGAG	R: CCCGAAGAGACGCTATT
mPdCIR085	(GA) <sup>29</sup>	F: GAGAGAGGGTGGTGTATT	R: TTCATCCAGAACCACAGTA
mPdCIR090	(GA) <sup>26</sup>	F: GCAGTCAGTCCCTCATA	R: TGCTTGAGCCCTTCAG
mPdCIR093	(GA) <sup>16</sup>	F: CCATTTATCATTCCCTCTCTTG	R: CTTGGTAGCTGCGTTTCTTG

intra-cultivar. Quant au palmier dattier, la multiplication d'un cultivar donné se fait traditionnellement grâce aux rejets qui assurent en principe, la conformité des caractéristiques de la plante mère. Cependant, certains facteurs environnementaux peuvent influencer la qualité des fruits (Rhouma 1994; Bouabidi et al. 1996). En effet, les qualités des dattes récoltées sur des palmiers appartenant à la même variété, diffèrent selon leur origine oasienne (Bouabidi 1998). Cette situation est bien illustrée dans le cas du cultivar 'Deglet Nour' dont les fruits ne présentent pas les mêmes caractéristiques s'ils sont récoltés sur des palmiers cultivés dans des oasis plus ou moins rapprochées. Ainsi, des variations intra-cultivar qui sont à l'origine de ces différences peuvent avoir lieu. Il

est donc indispensable de mettre en évidence cette diversité génétique intra-cultivar afin d'élucider ce problème. Tenant compte de ces considérations, nous avons jugé utile, dans une première étape, de mettre en évidence l'existence potentielle d'une conformité intra-cultivar chez cette espèce. Pour ce faire, nous avons conduit une expérimentation basée sur le génotypage microsatellite d'individus correspondant à des palmiers appartenant au même cultivar et collectés à partir de palmeraies différentes. Notre choix a porté sur deux individus du cultivar 'Deglet Nour' issus de Tozeur et de Kébili. De même, les deux individus du même cultivar portant deux appellations différentes (i.e. 'Rochdi' de Gabès et 'Arichti' de Tozeur) ont été également impliqués au cours de cette étude.

Les résultats obtenus montrent que pour tous les locus microsatellites ciblés, les diverses accessions testées présentent des empreintes génétiques identiques. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle les cultivars analysés se caractérisent par une grande stabilité génotypique. Ainsi, il apparaît clairement que pour un cultivar donné, la détermination du génotype d'un seul palmier appartenant à ce cultivar indépendamment de son origine géographique est suffisante pour connaître l'empreinte génétique du cultivar considéré. Il est important de noter que ce résultat est attendu si l'on considère que le palmier dattier se multiplie par la voie végétative à travers les rejets produits à la base de chaque plante (Djerbi 1995). Tenant compte de toutes ces considérations, nous avons entrepris le typage moléculaire de toutes les accessions tunisiennes de palmier dattier impliquées au cours de cette étude.

#### **Analyse du polymorphisme des microsatellites**

Au cours de cette étude nous avons élargi la technique d'amplification des locus microsatellites afin d'établir les empreintes génétiques des différentes accessions. Les résultats obtenus montrent que parmi les 16 couples d'amorces testés, 14 ont permis de générer des amplimères correspondants aux locus ciblés. A titre indicatif, la figure 1 représente un exemple typique des électrophorogrammes obtenus pour le locus mPdCIR50. Au total 100 allèles ont été mis en évidence avec un nombre moyen de 7,14 allèles par locus. Ce résultat traduit l'existence d'une importante diversité au sein de la palmeraie tunisienne. D'ailleurs, le nombre de génotypes par locus qui varie de 7 pour les deux locus mPdCIR16 et mPdCIR35 à 22 pour le locus mPdCIR78 renforce cette considération. En outre, tenant compte de tous les allèles identifiés, nous avons pu établir les empreintes génétiques de toutes les accessions étudiées. Ces empreintes correspondent aux génotypes multilocus mis en évidence au cours de cette étude.

Par ailleurs, nous avons mis à profit les différentes possibilités offertes par ces marqueurs microsatellites afin d'établir une clé d'identification variétale basée sur une classification hiérarchisée des locus selon le nombre respectif d'allèles observés. Ainsi, en considérant seulement les locus microsatellites mPdCIR78, mPdCIR85 et mPdCIR50, nous avons déterminé les génotypes multilocus des différents écotypes. L'analyse des résultats consignés dans le tableau

3 montre que les locus mPdCIR78, mPdCIR85 et mPdCIR50 présentent 26 allèles et permettent d'identifier un total de 62 génotypes différents. En effet, ces locus montrent la présence de 22, 21 et 19 génotypes différents pour mPdCIR78, mPdCIR85 et mPdCIR50, respectivement. Par ailleurs, en nous basant sur ces données, le locus mPdCIR78 permet à lui seul de différencier d'une façon unique 12 accessions. Il s'agit de 'Ghars Mttig', 'Angou', 'Bouhattam', 'Rhaimya', 'T158', 'DG9', 'Tazerzit Soda', 'Tazerzit Safra', 'Halwaya', 'T169', 'Besser Hlou' et 'Aguiwa'. Quant aux 10 génotypes restants, ils correspondent au moins à deux accessions. La combinaison de ces derniers avec ceux du locus mPdCIR85 montre qu'il est possible de distinguer 26 accessions différentes. L'exploitation des génotypes relatifs au locus mPdCIR25 a permis de différencier les 11 écotypes restants. Ce résultat montre clairement que les trois locus mPdCIR78, mPdCIR85 et mPdCIR25 suffisent à eux seuls pour déterminer les empreintes génétiques des 48 accessions tunisiennes de palmier dattier étudiées. Le diagramme illustrant la clé d'identification variétale ainsi obtenue est consigné dans la figure 2. Il en ressort que le pourcentage d'efficacité de 100% obtenu est largement supérieur à celui enregistré par l'utilisation d'autres marqueurs isoenzymatiques (Ould Mohamed Salem et al. 2001) ou moléculaires (Sakka et al. 2003). En effet, ces auteurs ont rapporté des pourcentages de 93% et de 71% pour les marqueurs isoenzymatiques et pour les CAPS, respectivement. Ce résultat témoigne de la puissance des marqueurs microsatellites pour le typage moléculaire dont les apports sont très précieux sur le plan de l'identification des rejets vendus et / ou échangés par les phoeniculteurs.

## Conclusion

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'explorer la diversité génétique de la palmeraie tunisienne en nous basant sur les marqueurs microsatellites. Ainsi, nous avons pu dans

une première étape mettre en évidence une conformité intracultivar en utilisant des accessions issues d'origines oasiennes différentes. Des résultats similaires ont été obtenus grâce à l'analyse des protéines enzymatiques (Ould Mohamed Salem 2001). De même, Trifi (2001) a montré que les patterns plasmidiques mitochondriaux et les profils d'amplification par RAPD de diverses accessions de la variété 'Deglet Nour' sont identiques en dépit de leurs diverses origines géographiques. En conséquence, nous pouvons suggérer que toutes les plantes d'une variété donnée, sont identiques entre elles et qu'elles dérivent les unes des autres à partir d'une même plante mère pour constituer un clone. Cette considération est en accord avec le mode de reproduction chez cette espèce: le palmier dattier est essentiellement multiplié végétativement par l'intermédiaire de rejets qui sont constamment échangés entre les phoeniculteurs. Il en résulte une forte homogénéité variétale aussi bien à l'intérieur d'une même palmeraie qu'à travers celle des différentes oasis. Toutefois, les facteurs environnementaux ainsi que certaines mutations pourraient se produire tout en étant à l'origine des variations observées concernant les caractères végétatifs de la plante et/ou du fruit. Dans ce cas, le mode de sélection pratiqué par les phoeniculteurs, aura comme effet d'éliminer ces variations dès leur apparition.

Dans une seconde étape, nous avons pu mettre à profit les possibilités offertes par les marqueurs microsatellites afin d'examiner la diversité génétique de la palmeraie tunisienne et d'établir le typage moléculaire de 48 accessions différentes. Les résultats obtenus témoignent aussi bien de la richesse de ce patrimoine phytogénétique que de l'efficacité de la technique SSR en terme de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez le palmier dattier. D'ailleurs, l'exploitation des données issues de cette étude montre qu'il est possible d'identifier spécifiquement toutes les accessions analysées grâce à leur empreinte génétique. Ainsi, le génotypage multilocus nous a permis de construire une clé d'identification variétale avec une efficacité absolue (100%) en nous basant uniquement sur trois locus. D'ailleurs, les locus considérés

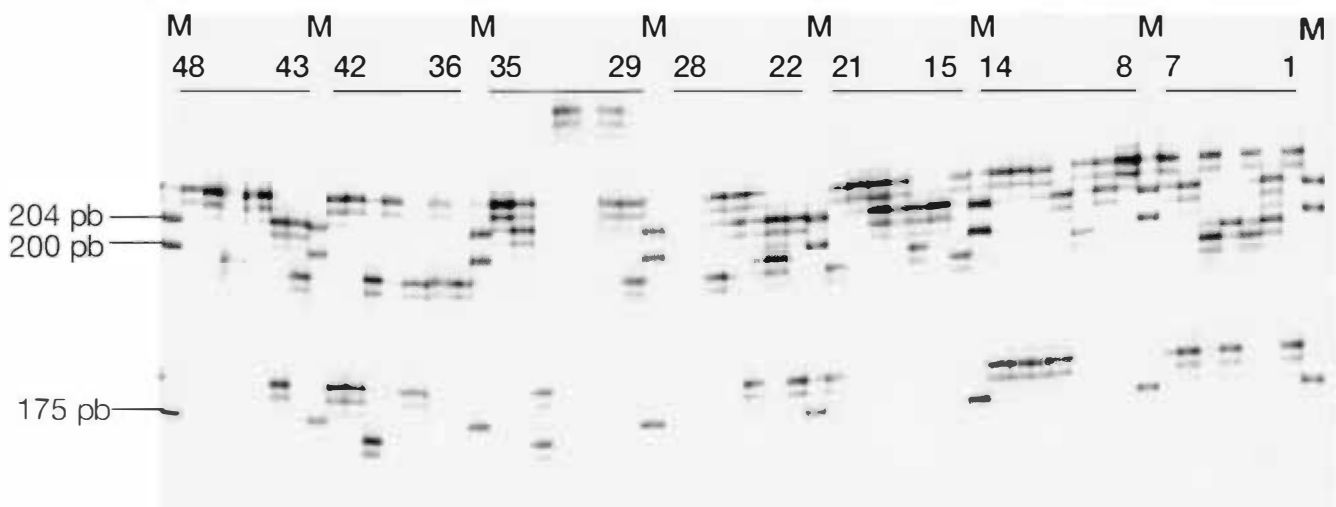


Figure 1. Exemple typique des électrophorégrammes sur gel de polyacrylamide à 6,5% obtenu pour le locus mPdCIR50 à partir des 48 accessions de palmier dattier.

Tableau 3. Génotypes multilocus des différents écotypes tunisiens de palmier dattier basés sur les locus microsatellites mPdCIR78, mPdCIR85 et mPdCIR25

Ecotype	mPdCIR78	mPdCIR85	mPdCIR50	Signification des allèles (taille en pb)
Deglet Nour	a3/a9	b6/b8	c2/c7	a1: 138
Boufagous	a1/a5	b1/b1	c5/c6	a2: 142
Ftimi	a1/a8	b4/b8	c4/c7	a3: 144
Kenta	a1/a1	b1/b8	c2/c5	a4: 148
Kintichi	a8/a8	b5/b6	c4/c7	a5: 153
Deglet Bey	a1/a8	b1/b8	c2/c6	a6: 157
Ghars Mttig	a1/a2	b1/b7	c7/c7	a7: 159
Zehdi	a3/a8	b5/b8	c7/c7	a8: 165
Arichti	a1/a9	b7/b8	c6/c7	a9: 171
Khouftimi	a1/a8	b4/b4	c5/c7	a10: 173
Horra	a3/a9	b5/b6	c2/c6	b1: 175
Okhet Degla	a1/a3	b6/b8	c2/c7	b2: 181
T124	a3/a8	b5/b8	c2/c7	b3: 183
T138	a3/a3	b5/b8	c5/c7	b4: 185
T158	a5/a8	b3/b3	c4/c7	b5: 187
T169	a7/a7	b5/b5	c6/c6	b6: 189
DF1	a3/a3	b5/b8	c2/c7	b7: 195
DG9	a5a10	b4/b4	c6/c7	b8: 197
Rochdi	a1/a9	b7/b8	c6/c7	c1: 172
Lemsi	a1/a7	b4/b5	c7/c7	c2: 180
Bouhattam	a1a10	b1/b8	c2/c4	c3: 196
Smiti	a1/a8	b6/b8	c2/c6	c4: 197
Denga	a1/a9	b1/b6	c5/c6	c5: 199
Hamra	a1/a7	b3/b6	c2/c7	c6: 204
Aguiwa	a8/a9	b6/b8	c6/c7	c7: 208
Kharroubi	a1/a8	b5/b5	c3/c7	c8: 222
Angou	a1/a4	b5/b8	c7/c7	
Bejjou	a1/a8	b7/b8	c3/c7	
Goundi	a1/a1	b4/b8	c3/c7	
Halwaya	a6/a9	b7/b7	c7/c8	
Tezerzit Safra	a6/a8	b1/b1	c8/c8	
Tezerzit Soda	a6/a6	b5/b7	c7/c8	
Ammari	a1/a1	b5/b8	c1/c2	
Besser Hlou	a7/a9	b5/b5	c6/c7	
Mahmoudia	a1/a1	b5/b8	c7/c7	
Chodak	a1/a8	b4/b8	c3/c3	
Rhaimya	a5/a6	b7/b8	c3/c7	
Om lal	a1/a1	b3/b7	c2/c3	
Om esseyed	a1/a7	b3/b3	c7/c7	
Bidh Hamam	a8/a8	b4/b5	c1/c3	
Gasbi	a1/a3	b1/b1	c2/c7	
Deglet Nour K	a3/a9	b6/b8	c2/c7	
Kchdou ahmar	a1/a9	b1/b1	c3/c6	
Fhal Ksebba	a1/a8	b1/b3	c2/c6	
Rakli	a1/a1	b3/b5	c7/c7	
Fermla	a1/a7	b2/b8	c5/c5	
T159	a1/a5	b1/b4	c7/c7	
Tamri	a1/a1	b5/b6	c7/c7	

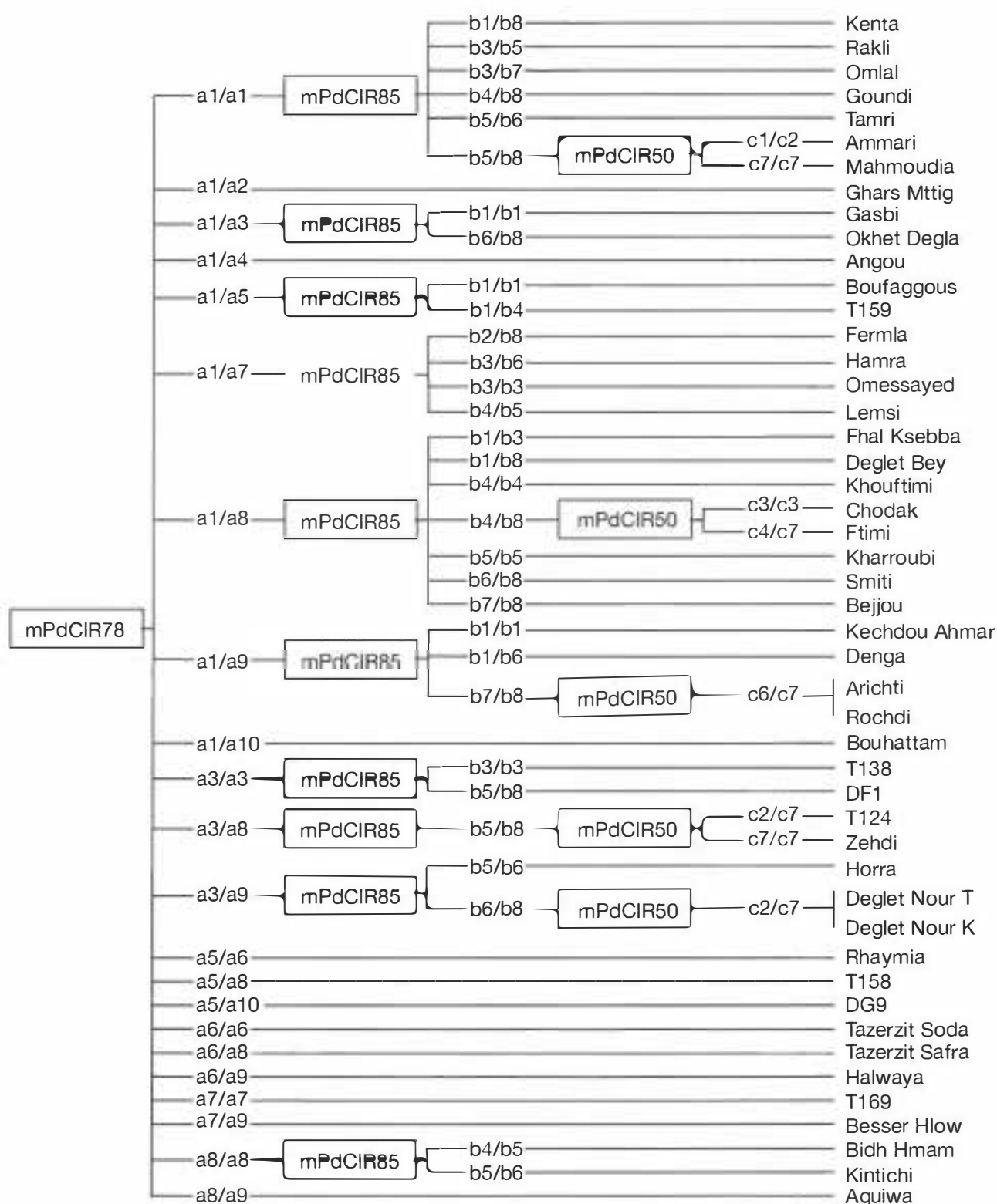


Figure 2. Diagramme illustrant la clé d'identification variétale de 48 écotypes tunisiens de palmier dattier.

permettent théoriquement d'identifier d'une façon unique et sans aucune ambiguïté 71280 écotypes de palmier dattier. Les travaux sont en cours de réalisation afin d'élargir cette étude à tout le germoplasme tunisien de palmier dattier afin d'établir les empreintes génétiques de notre patrimoine phoenicicole.

Les retombées de ces différentes actions seront d'un grand apport pour le typage moléculaire des variétés ainsi que pour le contrôle de la conformité des rejets et/ou des vitroplants produits industriellement par les diverses techniques de culture *in vitro*.



## Remerciements

Ce travail a été réalisé partiellement grâce au soutien financier du Ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie ainsi que de l'IPGRI (Projet FEM-PNUD-IPGRI, RAB 98 G31). Les auteurs tiennent à remercier l'équipe de recherche de l'IRD Montpellier et particulièrement les membres de DYNADIV et ceux du CIRAD de Montpellier pour leur aide et leur soutien.

## Références

- Alvarez AE, van de Wiel CCM, Smulders MJM, Vosman B. 2001. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. Theoretical and Applied Genetics 103:1283–1292.
- Billotte N, Marseillac N, Brottier P, Noyer JL, Jacquemoud-Collet JP, Moreau C et al. 2004. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization, utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. Molecular Ecology Notes 4:256–258.
- Bouabidi H. 1998. Morphological characteristics of the leading Tunisian date palm cultivars. In: Proceedings of the Date Palm Research and Development Network, ACSAD, Damas, Syrie. Marrakech, Maroc. pp. 163–169 (en arabe).
- Bouabidi H, Reynes M, Roussi MB. 1996. Critères de caractérisation des fruits de quelques cultivars de palmiers dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du sud Tunisien. Annales de l'INRAT 69:73–87.
- Djerbi M. 1995. Précis de phoeniculture. FAO, Rome, Italie. 191p.
- El Hadrami I, El Bellaj M, El Idrissi A, J'Aiti F, El Jaafari S, Daayif F. 1998. Biotechnologies végétales et amélioration du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. Cahiers de l'Agriculture 7:463–468.
- Ould Mohamed Salem A, Trifi M, Salhi-Hannachi A, Rhouma A, Marrakchi M. 2001. Genetic variability analysis of Tunisian date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. Journal of Genetics and Breeding 55:269–278.
- Reynes M, Bouabidi H, Piombo G, Risterucci AM. 1994. Caractérisation des principales variétés des dattes cultivées dans la région du Djerid. Fruits 49(4):289–298.
- Rhouma A. 1994. Le palmier dattier en Tunisie. Le patrimoine génétique. INRA de Tunisie. PNUD/FAO/RAB/88/024.
- Rhouma A. 1996. Le palmier-dattier en Tunisie: un secteur en pleine expansion. Cahiers Options Méditerranéennes 1(28):85–104.
- Sakka H, Zehdi S, Ould Mohamed Salem A, Rhouma A, Marrakchi M, Trifi M. 2003. Tunisian date-palm (*Phoenix dactylifera* L.) genotypes identification mediated by plastid PCR-RFLP based DNA. Journal of Genetics and Breeding 57:259–264.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Takrouni L, Rhouma A, Khoualdia O, Allouchi B. 1988. Observations préliminaires sur deux graves maladies d'origine inconnue du Palmier dattier en Tunisie. Annales de l'INRA de Tunisie 61:2–16.
- Testolin R, Marrazzo T, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori M T et al. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome 43:512–520.
- Trifi M. 2001. Polymorphisme et typage moléculaire de variétés tunisiennes de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): relation avec la résistance au bayoud. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences Naturelles, Université de Tunis El Manar, Faculté des Sciences de Tunis. 141p.



# **Plant Genetic Resources Newsletter**

## **Bulletin de Ressources Phytogénétiques**

## **Noticiario de Recursos Fitogenéticos**



**No. 145, 2006**



**Food and Agriculture Organization of the United Nations and the  
International Plant Genetic Resources Institute  
Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et  
l'Institut international des ressources phytogénétiques  
Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y  
el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos**